

## 緑膿菌(PA01株)接種による創傷治癒の促進:創部に 集積した好中球によるTNF- $\alpha$ 産生とその役割

著者	菅野 恵美
号	80
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第2879号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/62131">http://hdl.handle.net/10097/62131</a>

氏 名 <sup>かんの</sup>菅野 <sup>えみ</sup>恵美

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学位授与年月日 平成 23 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻

学 位 論 文 題 目 緑膿菌 (PAO1 株) 接種による創傷治癒の促進

: 創部に集積した好中球による TNF- $\alpha$ 産生とその役割

論 文 審 査 委 員 主査 教授 館 正弘

教授 張替 秀郎

教授 賀来 満夫

## 論 文 内 容 要 旨

【目 的】創傷治癒過程は表皮損傷直後よりおこる炎症反応に続き、組織修復がなされ治癒へと至る一連のプロセスである。これまでに創面への細菌負荷により治癒が促進することが報告されているが、詳細なメカニズムは解明されていない。細菌負荷により予想される宿主の反応として、好中球の遊走と炎症性サイトカイン産生が挙げられる。本研究では、これらの宿主反応を導くことが知られている緑膿菌を用い、ラット皮膚全層欠損創における緑膿菌の影響を明らかにするため、創部に集積する好中球の役割に注目し解析を行った。

【方 法】成熟雄 SD ラットの背側皮膚に皮膚生検用のパンチを用いて開放創を作成し、ただちに緑膿菌 PAO1 株を接種し、閉鎖環境においた (接種群)。緑膿菌を接種せずに閉鎖環境においた創 (非接種群) を対照とした。創作成 1、6、12 時間、1、3、5、7、10 日後に組織を摘出し、再上皮化率、表皮細胞の分裂、血管新生、好中球集積、サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、bFGF、VEGF、MMP-13) の発現について解析した。シクロホスファミドやラット好中球に対する抗体 RP3 を前投与して、好中球減少状態を作り緑膿菌汚染創の治癒過程における好中球の役割について解析した。また、緑膿菌接種により早期に産生される TNF- $\alpha$ の働きについて、ラットに生物活性を有するヒト TNF- $\alpha$ および抗 TNF- $\alpha$ 中和抗体を用いて解析した。

【結 果】1) 創部への緑膿菌接種により、創作成後 24 時間をピークとして創部に好中球が集積し、創作成 3 日目の上皮化、表皮細胞の分裂、血管新生の促進がみられた。2) 緑膿菌接種により、創作成 24 時間以内に創部ホモジネート中の TNF- $\alpha$ が mRNA および蛋白レベルで検出された。3) 非接種群と比べ接種群において、創部に遊走した好中球内 TNF- $\alpha$ がより高いレベルで検出された。4) 好中球減少状態のラットでは、対照のラットと比べ、緑膿菌による治癒促進と TNF- $\alpha$ 産生活性化の阻害

がみられ、さらにこれらの現象は TNF- $\alpha$ を投与することにより回復した。5) TNF- $\alpha$ 中和抗体投与により、緑膿菌による治癒促進と創部への好中球集積活性化の阻害がみられた。6) 表皮細胞の分裂や血管新生に関わるとされる bFGF と MMP-13 の発現は、好中球減少、抗 TNF- $\alpha$ 抗体投与により発現が低下した。

【結 論】本研究は、緑膿菌接種により創部に大量に集積した好中球が、TNF- $\alpha$ を産生し治癒促進に積極的に関与することを明らかにした。緑膿菌により、TNF- $\alpha$ 産生とそれによって誘導される好中球の集積が、無菌的に作成された創傷よりもより早く、より強く起こり、創作成3日目の治癒が促進したと考える。また、TNF- $\alpha$ 産生は bFGF と MMP-13 の発現を活性化することにより、表皮細胞の分裂や血管新生を促し、増殖期にも関与することが示された。今回の結果から、局所炎症反応の増強による治癒の促進が確認され、炎症反応をターゲットとした新しい創傷治療の可能性が拓かれた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題名 緑膿菌（PAO1 株）接種による創傷治癒の促進：創部に集積した好中球による  
TNF- $\alpha$ 産生とその役割

所属専攻・分野名 医科学 専攻・形成外科学 分野

学籍番号 氏名 菅野 恵美

創傷治癒過程は表皮損傷直後よりおこる炎症反応に続き、組織修復がなされ治癒へと至る一連のプロセスである。これまでに創面への細菌負荷により治癒が促進することが報告されているが、詳細なメカニズムは解明されていなかった。細菌負荷により、宿主側では好中球の遊走と炎症性サイトカイン産生が導かれる。本研究では、これらの宿主反応を導くことが知られている緑膿菌を用い、ラット皮膚全層欠損創における緑膿菌の影響を明らかにするため、創部に集積する好中球の役割に注目し解析が行われた。

本研究では、全ての実験で成熟雄 SD ラットを用い、ラットの背側皮膚に皮膚生検用のパンチを用いて開放創を作成し、ただちに緑膿菌 PAO1 株を接種し、閉鎖環境においた（接種群）。緑膿菌を接種せずに閉鎖環境においた創（非接種群）を対照とした。創作成 1、6、12 時間、1、3、5、7、10 日後に組織を摘出し、再上皮化率、表皮細胞の分裂、血管新生、好中球集積、サイトカイン（TNF- $\alpha$ 、bFGF、VEGF、MMP-13）の発現について解析した。シクロホスファミドやラット好中球に対する抗体 RP3 を前投与して、好中球減少状態を作り緑膿菌汚染創の治癒過程における好中球の役割について解析した。また、緑膿菌接種により早期に産生される TNF- $\alpha$ の働きについて、ラットに生物活性を有するヒト TNF- $\alpha$ および抗 TNF- $\alpha$ 中和抗体を用いて解析した。

本研究は、緑膿菌接種により創部に大量に集積した好中球が、TNF- $\alpha$ を産生し治癒促進に積極的に関与することを明らかにした。また、TNF- $\alpha$ 産生は bFGF と MMP-13 の発現を活性化することにより、表皮細胞の分裂や血管新生を促し、増殖期にも関与することが示された。今回の結果から、局所炎症反応の増強による治癒の促進が確認され、炎症反応をターゲットとした新しい創傷治療の可能性が拓かれたといえる。

本研究は、創傷治癒機転を新たな視点から検討した研究である。着眼点がユニークであるだけでなく、その着眼点を実証するために必要な実験がなされており、臨床応用が期待できる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。